

Difúzní metody

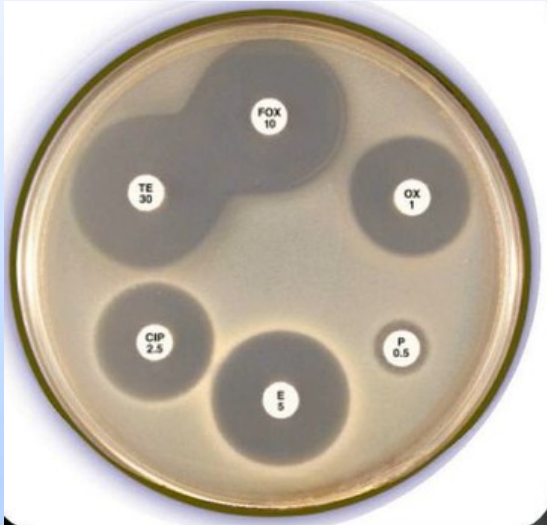
Disková difúzní metoda (kvalitativní)

E-test (kvantitativní)

Update 2023

L.Pokludová MU_CZ

DDM vs E-test



Disková difúzní metoda:

- **Kvalita**tivní test
- Výsledky C=citlivý, R=rezistentní, I= citlivý, zvýšená expozice
- Plotny s agarem, disky s antibiotikem, difúze antibiotika do agaru z disku, na povrch agaru naočkován testovaný mikr.
- V místě, kde působí koncentrace antibiotika dostatečně inhibičně je „projasněná“ zóna bez nárůstu = inhibiční zóna
- Pozor na správné odečítání, nutno měřit průměry inhibičních zón = > ATM s velkými molekulami poskytují menší zóny (z důvodu horší mobility/difúze)



E-test

- **Kvanta**tivní test
- Výsledky: lze odečíst hodnotu MIC
- Plotny s agarem, disky s proužky napuštěnými gradientem antibiotika, difúze antibiotika do agaru, na povrch agaru naočkován testovaný mikroorganismus
- V místě, kde působí koncentrace antibiotika dostatečně inhibičně je „projasněná“ zóna bez nárůstu = **elipsoidní** inhibiční zóna
- Pozor na správné odečítání, nutno správně kvalifikovat místo, kde protne hranice inhibiční zóny příslušnou koncentrací ATM (vytištěno na proužku)

Disková difúzní metoda

KVALITATIVNÍ metoda poskytující výsledky

C ... citlivost (susceptibility)

R ... rezistence (resistance)

I ... citlivý, zvýšená expozice (dříve intermediárně citlivý, intermediate)

Nově (2019) EUCAST uvádí I = Citlivý, zvýšená* expozice**

* v EN EUCAST: „Susceptible, Increased exposure“ zachovává zkratku „I“ pro tuto kategorii;

** expozice mikroorganismu v místě infekce závisí na způsobu podávání, dávce, dávkovacím intervalu a době infúze antimikrobního přípravku, a rovněž na jeho distribuci, metabolismu a exkreci.

Nově (2017) CLSI uvádí pojem necitlivý (nonsusceptible)

... tam kde je R raritní nebo nedefinovaná)

Disková difúzní metoda

- **Cílem je** prokázat rezistenci (citlivost) testovaných bakteriálních kmenů k antibakteriálním látkám.
- **Rozsah :**
 - vhodná především ke stanovení citlivosti (rezistence) u **rychle rostoucích** nenáročných bakterií.
 - méně vhodná pro pomalu rostoucí bakterie a bakterie se speciálními nároky (včetně anaerobů)
 - pro tyto druhy bakterií jsou vyvinuty modifikace metod, půd i kultivačních podmínek.

Poslední aktualizace EUCAST verze 10.1, leden 2023 viz :

- [Manual v 11.0 EUCAST Disk Test 2023.pdf](#)

Disková difúzní metoda - princip

- Metoda je založena na inokulaci standardizovaným inokulem mikroorganismů - původců patogeního procesu, na povrch média - nejčastěji Mueller - Hinton Agarů rozplněného na Petriho miskách.
- Po inokulaci a odsátí přebytečného množství inokula jsou na povrch média umístěny standardní papírové disky s antimikrobiální látkou.
- Po předepsané inkubaci (16-20 hodin (EUCAST nebo specificky dle druhu mikroorganismu) je měřen průměr zón inhibice okolo každého disku.
- Při dodržení všech kroků standardizovaného postupu platí pravidlo, že velikost zón je inverzně proporcionální k breakpointu MIC mikroorganismů a je důležitá pro určení terapeuticky dosažitelné hladiny léčiv v krvi při systémových onemocněních nebo hladiny v moči při močových infekcích.
- Metoda je standardní a spolehlivá za předpokladu přísného dodržení pracovního postupu, přesného měření inhibičních zón, přesného systému kontrol a správné interpretace.

Disková difúzní metoda - význam

- **Základní výsledky** stanovení slouží jako podklad pro výběr antimikrobních látek se zaměřením na cílenou léčbu onemocnění způsobenou zkoumaným infekčním agens.
- **Rozšířené výsledky** (včetně výsledků testování látek nepoužívaných v terapii) slouží jako podklad pro monitorování a přehledy rezistence.
- **Speciální výsledky** pro účely taxonomické nebo pro účely laboratorního ověřování nově registrovaných přípravků.

Disková difúzní metoda

- **Pozn.**

Výsledky kvalitativního vyšetření diskovou difúzní metodou nemusí být vždy dostačující pro výběr, dávkování a léčbu některých infekcí, které vyžadují kvantitativní stanovení MIC (sepsy, meningitis, endokarditis ...).

Půdy pro kultivaci

Nenáročné bakterie: Mueller-Hinton agar

Enterobacterales

Pseudomonas spp.

Stenotrophomonas maltophilia

Acinetobacter spp.

Staphylococcus spp.

Enterococcus spp.

Aeromonas spp.

Achromobacter xylosoxidans

Burkholderia pseudomallei

Vibrio spp.

Bacillus spp.

Die EUCAST verze 11.0, 2023

Náročné bakterie:

Mueller-Hinton agar + 5% mechanicky defibrinované koňské krve + 20 mg/L β - NAD (MH-F)

Streptococcus pneumoniae

Streptokoky sk A,B, C a G

Sk viridujících streptokoků

Haemophilus influenzae

Moraxella catarrhalis

Listeria monocytogenes

Pasteurella multocida

Campylobacter jejuni a *C. coli*

Corynebacterium spp.

Aerococcus sanguinicola a *urinae*

Kingella kingae

Disková difúzní metoda

kultivační média

- **Mueller - Hinton agar (MHA) - komerčně vyráběné medium :**
MHA bez obohacení vyhovuje pro testování citlivosti většiny nenáročných kmenů. Růst některých druhů lze podpořit přidáním 5% defibrinované koňské/(dříve se doporučovala a používala i beraní) krve do půdy - vznikne :
- **Krevní Mueller-Hinton agar (KMHA) -**
komerční základ MHA + 50 ml defibrinované koňské (dříve i beraní) a 20 mg β -NAD krve na 1000 ml půdy vychlazené na max 45 °C a pečlivé promíchávání.

K testování citlivosti hemofilů a gonokoků lze použít speciální komerční produkty např.:

- **MH – F (dle EUCAST) nahradil Haemophilus test medium - (HTM) – dle CLSI**

dříve se také používalo v laboratoři připravené médium:

- **Čokoládový Mueller - Hinton agar (ČMHA)**
Pozor ! výsledky citlivosti některých antimikrobiálních látek jsou na tomto médiu podhodnoceny - např. sulf / trimetoprim.

Příprava inokula (dle růstové náročnosti mikroorganismů):

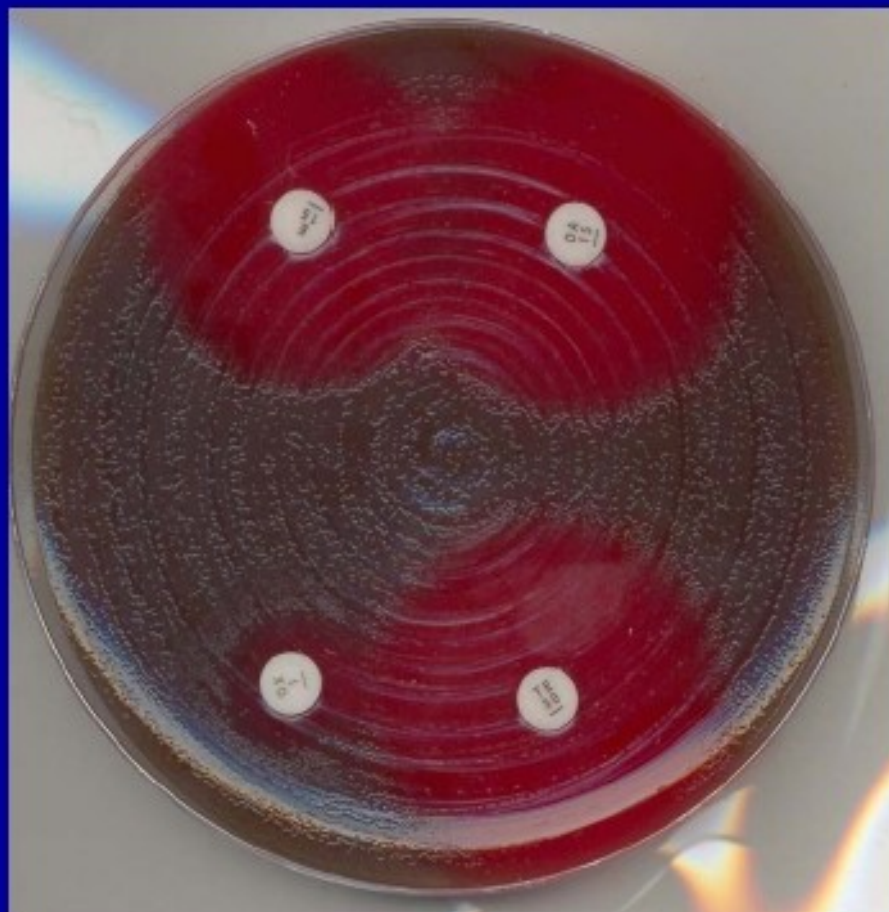
- Fyziologický roztok
- Živný bujon
- **Mueller - Hinton živný bujon (MHB)**

Mueller-Hinton-fastidious (MH-F)

Mueller-Hinton agar + 5% defibrinated horse blood
and 20 mg/L β -NAD

S. pneumoniae ATCC 49619

H. influenzae NCTC 8468



Disková difúzní metoda

standardizace metody – kultivační médium

DNES již často komerčně dodáváno rozplněné

Pokud provádíte experimenty a půdy si připravujete sami:

Rozplnění sterilního kultivačního média

- po 25 ml u P.M. o průměru 90 mm ... na jednotlivé P.M.
- Po 31 ml u P.M. o průměru 100 mm
- Po 71 ml u P.M. o průměru 150 mm
- Po 40 ml na čtvercové plotny (100 x 100 mm)

Zkontrolovat zejména při nákupu nových misek skutečně potřebný objem pro dosažení **4mm vrstvy** !!!

Nalévat na přesně vodorovné podložce (kontrola vodováhou):
výška agaru 4 mm.

Pozor při doplňování suplementů (**krev, NAD**) nutno **půdu ochladit** na cca **42 – 45 °C**

Disková difúzní metoda

standardizace metody: uchovávání ploten s kultivačním médiem

● Uchovávání P.M.

- Jedna až tři misky z každé připravené série se inkubují při 37°C / 24 hodin pro **kontrolu sterility** (v odděleném termostatu).
- Plotny lze uchovat týden při chladničkové teplotě +4°C. Zatavením ploten do sáčků nebo důkladným přebalem alobalem lze zamezit odparu vody a prodloužit dobu použitelnosti na 2 týdny po přípravě.
- Před použitím je nutno odstranit kapky kondenzní vody na povrchu ploten krátkým předsušením (**bez víčka, do 15 minut / 35°C (EUCAST, 2019)**)
- Sledujte/respektujte rovněž pokyny výrobce médií.

Disková difúzní metoda

standardizace metody: vlhkost ploten

- Před inokulací plotny mají mít pokojovou teplotu
- Povrch agaru před použitím nesmí vykazovat známky přebytečné vlhkosti
- Plotny ale nesmějí být ani přesušené
 - v žádném případě ne odchlípující se agar od stěn misky, prasklinky!
- Kapičky vody na agaru nebo víčku misek(zejména pozor u ploten skladovaných v sáčku, alobalovém přebalu)
 - Nadbytek vlhkosti způsobuje neostré okraj zón, povlak uvnitř zón
- Plotny lze předsušit v případě potřeby:
 - při 20-25°C, nebo
 - s odkrytým víčkem 35°C/15 min (zde pozor na kontaminaci!)

Disková difúzní metoda - disky

Spektrum testovaných antimikrobiálních látek závisí :

- druhu testovaného mikroorganismu
- typu infekce a k tomu odpovídajících antibiotik např. podle schopnosti pronikat do určitých tkání
- typu zvířete (druh, stáří, potravinové – nepotravinové)
- účelu vyšetření - viz základní, rozšířené a speciální typy testů
- dostupnosti testovaných antibiotik (u určitých typů antimikrobiálních látek lze testovat analoga nebo zástupce určité farmakologické skupiny a výsledky vztáhnout a interpretovat pro jednotlivá atb)

Při použití Petriho misek s maximálním průměrem 9 cm by měla sestava obsahovat maximálně 6 disků. Sestavy by měly být po určité období víceméně stabilní (pro možnost srovnávání výsledků).

Pro kladení stabilních sestav disků lze použít tzv. disk dispensorů = dávkovačů pro atb disky, kde můžeme zachovat i pořadí disků (výhodné pro poloautomatické nebo automatické hodnocení).

Disková difúzní metoda

standardizace metody - disky

Uchovávání disků

- Disky se uchovávají v závislosti na druhu antibiotika a doporučení výrobce v rozmezí -20°C až $+4^{\circ}\text{C}$. Na obalu disků musí být vyznačeno datum expirace a přesný způsob uchovávání disků.
- Pozor na disky s labilními antibiotiky (řídít se pokyny výrobce)
- Nelze používat disky s prošlou expirací, nebo s nevhodným způsobem uskladnění.
- Disky distribuované v dávkovacích kontejnerech, které po prvním otevření umožňují navlhání skladujeme v uzavřených zkumavkách s gumovou zátkou s tbl absorbující vlhkost (ta je přiložena v původním balení).
- Dvě hodiny před použitím se disky umístí do pokojové teploty pro odstranění kondenzní vody. Lépe je ponechat disky během pracovního dne v pokojové teplotě než je opakovaně vytahovat a ukládat do lednice.

Pozn . Disky musí vykazovat odpovídající reakci s citlivým referenčním mikroorganismem

Disková difúzní metoda: standardizace metody - inokulum

Příprava inokula o vyhovující koncentraci buněk:

používá se fyziologický roztok -
zákalový standard 0,5 dle McFarlanda
odpovídající koncentraci:

1 - 2 x 10⁸ buněk/ml pro *E. coli*...

EUCAST, 2019 + video)

Výběr dobře izolovaných kolonií
vyrostlých přes noc na neselektivní půdě



Výjimka: *S. pneumoniae* 0.5 McFarland z krevního agaru,
ALE 1.0 McFarland z čokoládového agaru

Hodnocení referenční suspenze a suspenze
mikroorganismů pomocí zákalometru.

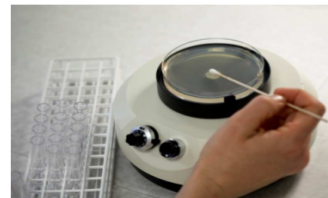
Poznámky

- Lze použít tampónu a rotačního plotnového inokulátoru
- Pro G+ nevymačkávat tampon o stěnu zkumavky, dávat VELMI pozor, aby bylo skutečně hustě, bez mezer naočkováno
- Pro G- lehce vymáčknout tampón o stěnu zkumavky, lehce opět, pokud možno bez mezer naočkovat
- Inokulujete-li pouze rukou+tamponem, použít křížem 3 směry

https://www.youtube.com/watch?v=iRveNVZ-xxk&index=2&list=PLQU_kWRWBId4X9Acg59iNKIj4QwNRJShJ

Inokulace ploten

- Inokulum se roztírá tamponem ve třech směrech nebo rotátorem tak, aby byl naočkován celý povrch plotny.
- U grampozitivních bakterií se dbá se zvlášť pečlivě na to, aby nevznikly žádné mezery mezi očkovacími čarami.
- Očkuje-li se stejné inokulum na několik ploten, pak se tampon vždy před očkováním na další plotnu ponoří do suspenze.



Disková difúzní metoda

standardizace metody – referenční mikroorganismy

- **Referenční mikroorganismy**
 - jsou kmeny se stabilními vlastnostmi a známou citlivostí k antibiotikům poskytované sbírkami typových kultur.
 - Slouží pro kontrolu přesnosti stanovení a kontrolu dodržování standardní hustoty inokula a standardního pracovního postupu.
 - S touto kontrolou je nutno pracovat nejlépe při každé sérii stanovení, zcela nezbytná je pak kontrola každé nové série pūd a disků.

Kontrola kvality MH dle EUCAST

- Ověření, zda zejména kvalita nárůstu a velikost inhibičních zón odpovídá referenčním hodnotám se sbírkovými kmeny:

Indikátory problémů jsou:

- ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853:**
 - Inhibiční zóny **AMINOGLYKOSIDŮ** o menším/větším průměru než je dolní/horní limit indikují vysokou/nízkou hladinu **dvojmocných kationtů** v kultivační půdě !
- **Enterococcus faecalis ARCC 29 212:**
 - Inhibiční zóny **SULFAMETHOXAZOLU/TRIMETHOPRIMU** o menším průměru než je dolní limit ukazují an vysoký obsah **thyminu a thymidinu** v půdě

Obecně interferující látky a parametry ovlivňující správnost výsledků

- **Nízký obsah živných látek** je příčinou zvětšení zón inhibice.
- **Výška agarové vrstvy** nízká vrstva způsobuje neúměrné zvětšení zón inhibice
- **Hustota inokula** nízká hustota způsobuje neúměrné zvětšení zón inhibice
vysoká hustota způsobuje neúměrné zmenšení zón inhibice
- **Nesprávně** připravený nebo znehodnocený **zákalový standard**.
- **Kontaminace** testovaného kmene ze vzorku nebo referenčního kmene
- **Změna vlastností** referenčního kmene, která způsobuje zkreslení v hodnocení výsledků.
- **Nestandardní obsah antibiotika v disku** způsobený prošlou expirací, nesprávným skladováním nebo navlhnutím disků.
- **Obsah iontů Ca a Mg** v testovacím médiu : např při vysokém obsahu těchto iontů mají i kmeny citlivé k aminoglykosidům inhibiční zóny menší než je limit citlivosti, (ko kvality ***P. aeruginosa* ATCC 27853 (EUCAST)**), problémy i s tetracykliny
- **Krevní komponenty** (vyjma koňské krve) obsahující thymidin a ovlivňující výsledky sulfonamidů, trimetoprimu a jejich kombinací. Výsledky pro tato antibiotika na KMHA s beraní krví bývají podhodnocovány. Ko kvality s kmenem ***E. faecalis* ATCC 29212 (EUCAST)**
- **pH půdy :** nižší pH nižší účinnost makrolidů a aminoglykosidů, vyšší tetracyklinů a beta-laktámů a naopak.

Disková difúzní metoda,

aneb na detailech záležití, testujte a interpretujte dle metodik vydaných stejným úřadem (v max možném rozsahu)

- **Kultivace mikroorganizmu** základní či speciální (např. selektivní média)
- **Příprava inokula a inokulace** velice záležití na čistotě kultury ! Většina „podivných“ výsledků je v důsledku kontaminace testované kultury.
- **Kladení disků**
(manuálně, dispenzorem – neposunovat již jednou umístěné disky !)
- **Inkubace**
s ohledem na specifické kultivační nároky mikroorganismů
- **Odečet výsledků a hodnocení**
(automatický, poloautomatický, manuální odečet)
- **Interpretace a odeslání výsledků**

viz též **Guidance on breakpoint table, EUCAST, 2017:**

https://www.youtube.com/watch?v=pH1WaVgPRnY&index=5&list=PLQU_kWRWBld4X9Acg59iNKIj4QwNRJShJ

K inokulaci ploten
Ize použít tzv.
„disc dispenzorů“



The 15-15-15 minute rule

Prepare plates so that you:

- Use the inoculum within **15 minutes** of preparation – and never beyond 60 minutes.
- Apply disks within **15 minutes** of inoculating plates.
- Start incubation within **15 minutes** of application of disks.

EUCAST 2010 Version 1.1

20

VIDEO –EUCAST:

(zdroj EUCAST®)

https://www.youtube.com/watch?v=S3SQ2Bptv9Q&index=3&list=PLQU_kWRWBld4X9Acg59iNKlj4QwNRJShJ&t=0s

Inkubace ploten

- Plotny se obrátí víčkem dolů (zjistí se přilnutí disků k agaru, nesmějí odpadnout)
- Do 15 minut od naočkování přesun ploten do inkubátoru
- Nejlépe sloupce max 5 miskách), kvalitní a rovnoměrné prohřátí, myslet na kapacitu inkubátoru, aby byla reálná cirkulace tepla a prohřátí (respektovat kvalitativní parametry inkubátoru).
- Plotny se standardním médiem MH pro nenáročné bakterie se inkubují při 35°C ve vzduchu (není potřeba generovat specifické prostředí).
- Plotny s MH-F (tedy růstově náročnými) se inkubují v mikroaerofilním prostředí (inkubátor s 4-6% CO₂), teplota rovněž 35°C.

Inkubační teploty + atmosféra + čas

Incubation of plates

Organism	Incubation conditions
Enterobacterales	35±1°C in air for 18±2 h
<i>Pseudomonas</i> spp.	35±1°C in air for 18±2 h
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	35±1°C in air for 18±2 h
<i>Acinetobacter</i> spp.	35±1°C in air for 18±2 h
<i>Staphylococcus</i> spp.	35±1°C in air for 18±2 h
<i>Enterococcus</i> spp.	35±1°C in air for 18±2 h (24 h for glycopeptides)
<i>Aeromonas</i> spp.	35±1°C in air for 18±2 h

Vibrio spp., *Bacillus* spp., 35±1°C air 18±2h

Achromobacter xylosoxidans, *Burkholderia pseudomallei* * 35±1°C air 18±2h

*nově dle edice 11.0 z ledna 2023

Inkubační teploty + atmosféra + čas

Incubation of plates

Organism	Incubation conditions
Streptococcus groups A, B, C and G	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h
Viridans group streptococci	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h
<i>Haemophilus influenzae</i>	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h
<i>Moraxella catarrhalis</i>	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h
<i>Pasteurella multocida</i>	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h
<i>Campylobacter jejuni</i> and <i>coli</i>	41±1°C in microaerobic environment for 24 h (40-48 h)
<i>Corynebacterium</i> spp.	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h (40-44 h)
<i>Aerococcus sanguinicola</i> and <i>urinae</i>	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h (40-44 h)
<i>Kingella kingae</i>	35±1°C in air with 4-6% CO ₂ for 18±2 h (40-44 h)
Other fastidious organisms	Pending

Podmínky zástupce rodu kampylobakter

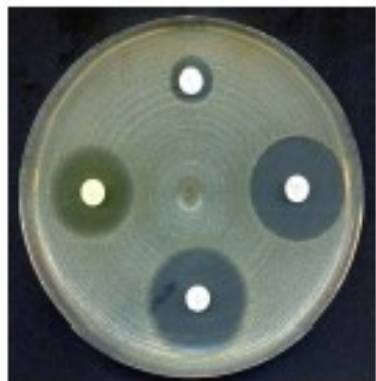
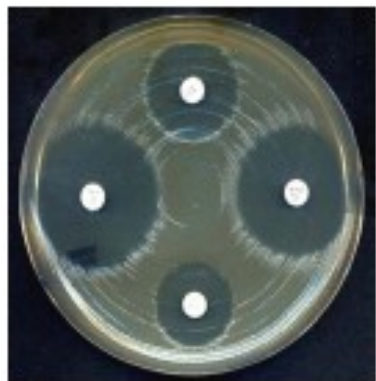
Appendix A

Disk diffusion testing of *Campylobacter jejuni* and *coli*

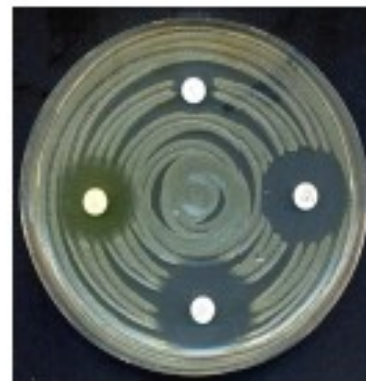
The following methodology (Table A1) must be adhered to when performing disk diffusion testing of *Campylobacter jejuni* and *coli* according to EUCAST.

Table A1	Disk diffusion methodology for <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>coli</i>
Medium	Mueller-Hinton agar supplemented with 5% defibrinated horse blood and 20 mg/L β -NAD (MH-F) In order to reduce swarming, the MH-F plates should be dried prior to inoculation (at 20-25°C overnight, or at 35°C, with the lid removed, for 15 min).
Inoculum	0.5 McFarland
Incubation	Microaerobic environment 41±1°C 24 h Incubation should result in confluent growth. Some <i>C. coli</i> isolates may not have sufficient growth after 24 h incubation. These are re-incubated immediately and inhibition zones read after a total of 40-48 h incubation. An incubation temperature of 41±1°C was chosen to create favourable conditions for growth of <i>Campylobacter</i> spp.
Reading	Read MH-F plates from the front with the lid removed and with reflected light. Zone edges should be read at the point of complete inhibition as judged by the naked eye with the plate held about 30 cm from the eye and at a 45-degree angle to the work bench.
Quality Control	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560

Na inokulaci záleží !



Plates should look like this..



..and NOT like this!

Disková difúzní metoda: hodnocení

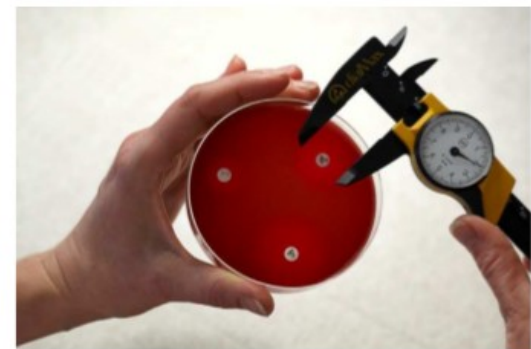
- Odečítají se pouze misky s kontinuálním nárůstem.
- **Průsvitná média** (MHA, *Haemophilus* test medium, GC agar base)
 - 1) Miska se umístí asi 5 - 7 cm nad černým matným povrchem dnem vzhůru.
 - 2) Osvětlení misky je nejlepší pod úhlem 45 °.
 - 3) Změří se velikost inhibiční zóny s přesností na milimetry přiložením přesného měřítka.
 - 4) Pro stafylokoky a penicilináza rezistentní druhy penicilinů (oxa, met, naf)
 - se použije prosvětlení misky
 - je nutno provést pečlivé pozorování : jakýkoliv nárůst i jednotlivých kolonií je považován za přítomnost rezistence (resp. heterorezistentní populace).
- **Neprůsvitná média** (MH-F (KMHA), ČMHA)
 - 1) Nárůst na misce je nutno hodnotit bez víčka s úhlem dopadajícího světla 45 °.
 - 2) Velikost zóny se měří kontaktním měřítkem přímo na povrchu agaru.
 - 3) Jsou - li testovány hemolytické mikroorganismy měří zóna inhibice je měřena od povrchu kolonie nikoliv od zóny hemolýzy.

Po inkubaci se změří průměry inhibičních zón :

- u dobře patrných zón s ostrou hranicí lze pro přesnost použít např. analyzátor obrazu Lucia
- používají se rovněž jiné automatické readery (VITEC, OXOID)
- u zón s neostrou hranicí nebo u kmenů se špatně patrným nárůstem použijeme posuvné měřítko

Odečítání zón

- Plotny **MH** se odečítají ze spodní strany proti tmavému pozadí v odraženém světle.
- Plotny **MH-F** se odečítají po odstranění víčka z horní strany v odraženém světle.



Hranice zóny se odečítá tam, kde je hranice úplné inhibice růstu viditelná pouhým okem

Examples:



E. coli
Ciprofloxacin



S. aureus
Erythromycin



CoNS
Trimethoprim



S. pneumoniae
Rifampicin

Disková difúzní metoda: hodnocení

- **Při měření zón nebereme v úvahu:**

- plazivý růst uvnitř jinak dobře ohraničené inhibiční zóny v případě kmenů rodu *Proteus*
- jemný nárůst velmi drobných kolonií uvnitř zón vytvořených okolo disků se sulfonamidy nebo kombinací sulfonamidy a trimetoprimem
- jemné podrůstání kolonií přes jinak zřetelně patrnou hranici inhibiční zóny

- **Dalšímu testování rezistence a identifikaci** podrobíme větší a velké kolonie rostoucí uvnitř zón inhibice, je nutno se zaměřit na takové kolonie zejména v případě:

- testování penicilináza rezistentních penicilinových antibiotik u kmenů stafylokoků
- testování heterogenních populací heterorezistentních stafylokoků
- testování rezistence vankomycinu u enterokoků

Dojde - li při testování subkultur kolonií z vnitřní plochy zón k opakování jevu (a kultura se jeví morfologicky jako čistá) nebo je - li zóna menší, hodnotíme kmen jako rezistentní.

Interpretace citlivosti nebo rezistence se provede dle tabulek uváděných aktuálně Národní referenční laboratoří pro antibiotika při SZU v Praze.

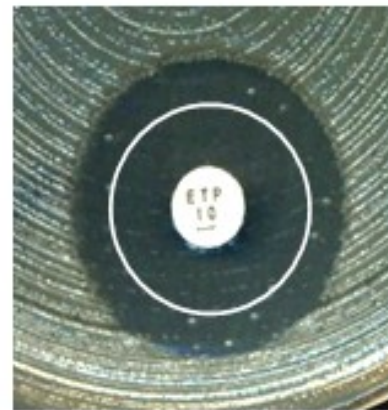
Odečítání zón – výjimky (I)

Organism	Antimicrobial agent	Reading inhibition zones
<i>Enterobacterales</i>	Ampicillin Ampicillin-sulbactam Amoxicillin-clavulanic acid	Ignore fine growth that may appear as an inner zone on some batches of MH agar.
<i>Enterobacterales</i>	Temocillin	Ignore isolated colonies within the inhibition zone.
<i>Enterobacterales</i>	Mecillinam	Ignore isolated colonies within the inhibition zone.
<i>E. coli</i>	Fosfomycin	Ignore isolated colonies within the inhibition zone and read the outer zone edge.
<i>Proteus</i> spp.	Any	Ignore swarming.
<i>S. maltophilia</i> , <i>A. xylosoxidans</i> and <i>B. pseudomallei</i>	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Ignore growth within the zone if any zone edge can be seen, even when growth within the zone is substantial.
<i>S. aureus</i>	Benzylpenicillin	Examine zone edge from the front of the plate with transmitted light (plate held up to light).

Odečítání zón – výjimky (II)

Organism	Antimicrobial agent	Reading inhibition zones
Staphylococci	Cefoxitin	Examine zones carefully to detect colonies within the inhibition zone.
<i>Enterococcus</i> spp.	Vancomycin	Examine zone edge from the front of the plate with transmitted light (plate held up to light).
<i>Streptococcus</i> spp.	Any	Read inhibition of growth and not the inhibition of haemolysis.
<i>H. influenzae</i>	Beta-lactam agents	Read the outer edge of zones where an otherwise clear inhibition zone contains an area of growth around the disk.
<i>Aeromonas</i> spp.	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Read the obvious zone edge and disregard haze or growth within the inhibition zone
Any	Trimethoprim Trimethoprim-sulfamethoxazole	Ignore faint growth up to the disk and measure at the more obvious zone edge.

Kolonie, které nelze považovat za kontaminaci by měly být při odečtu brány v úvahu (zdroj EUCAST®):



Reading of zones with colonies within the zone.

Kontrola kvality je důležitá!

EUCAST routine quality control strains

Organism	Culture collection numbers	Characteristics
<i>E. coli</i>	ATCC 25922; NCTC 12241; CIP 76.24 DSM 1103; CCUG 17620; CECT 434	Susceptible, wild-type
<i>E. coli</i>	ATCC 35218; NCTC 11954; CIP 102181 DSM 5923; CCUG 30600; CECT 943	TEM-1 β -lactamase producer
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603; NCTC 13368 CCUG 45421; CECT 7787	ESBL producer (SHV-18)
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC BAA-2814	KPC-3, SHV-11 and TEM-1
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853; NCTC 12903; CIP 76.110 DSM 1117; CCUG 17619; CECT 108	Susceptible, wild-type
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213; NCTC 12973; CIP 103429 DSM 2569; CCUG 15915; CECT 794	Weak β -lactamase producer
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212; NCTC 12697; CIP 103214 DSM 2570; CCUG 9997; CECT 795	Susceptible, wild-type

EUCAST routine quality control strains

Organism	Culture collection numbers	Characteristics
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 49619; NCTC 12977 CIP 104340; DSM 11967 CCUG 33638	Reduced susceptibility to benzylpenicillin
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49766; NCTC 12975 CIP 103570; DSM 11970 CCUG 29539	Susceptible, wild-type
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560; NCTC 11351 CIP 70.2T; DSM 4688 CCUG 11284	Susceptible, wild-type

Kmeny pro detekci specifických mechanismů rezistence EUCAST (rozšířená kontrola kvality)

Organism	Culture collection numbers	Characteristics
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 700603; NCTC 13368 CCUG 45421; CECT 7787	ESBL producer (SHV-18)
<i>S. aureus</i>	NCTC 12493; CCUG 67181	<i>mecA</i> positive, methicillin resistant (MRSA)
<i>E. faecalis</i>	ATCC 51299; NCTC 13379 CIP 104676; DSM 12956 CCUG 34289	High-level aminoglycoside resistant (HLAR) and vancomycin resistant (<i>vanB</i> positive)
<i>H. influenzae</i>	ATCC 49247; NCTC 12699 CIP 104604; DSM 9999 CCUG 26214	Reduced susceptibility to β -lactam agents due to PBP mutations

Culture Collections

ATCC American Type Culture Collection, USA

<http://www.atcc.org>

NCTC National Collection of Type Cultures, Public Health England, UK

<https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc>

CIP Collection de l'Institut Pasteur, France

<https://www.pasteur.fr/en/public-health/biobanks-and-collections/collection-institut-pasteur-cip>

DSM Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

<https://www.dsmz.de>

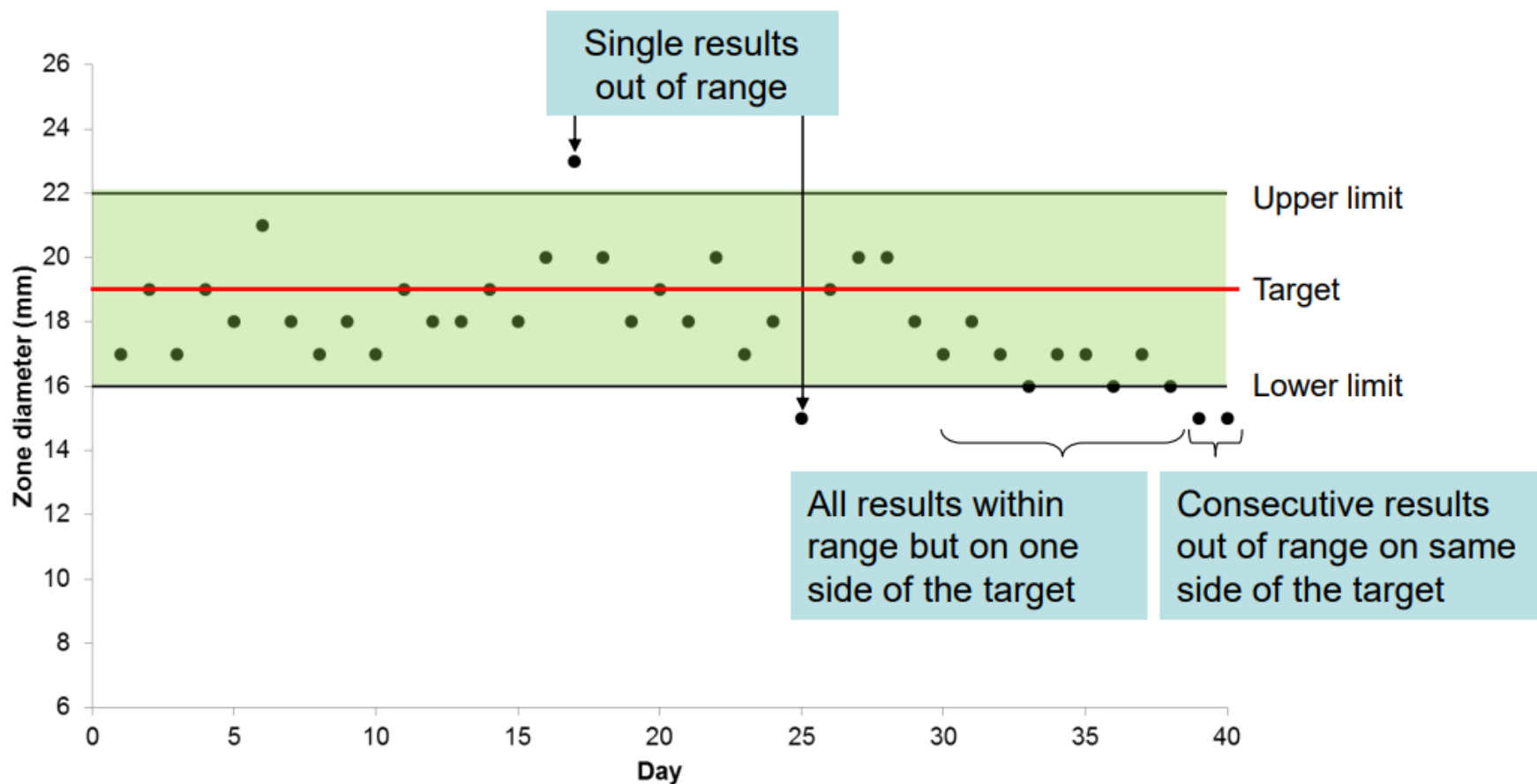
CCUG Culture Collection University of Gothenburg, Sweden

<http://www.ccug.se>

CECT Colección Española de Cultivos Tipo, Spain

<http://www.cect.org>

Monitoring test performance

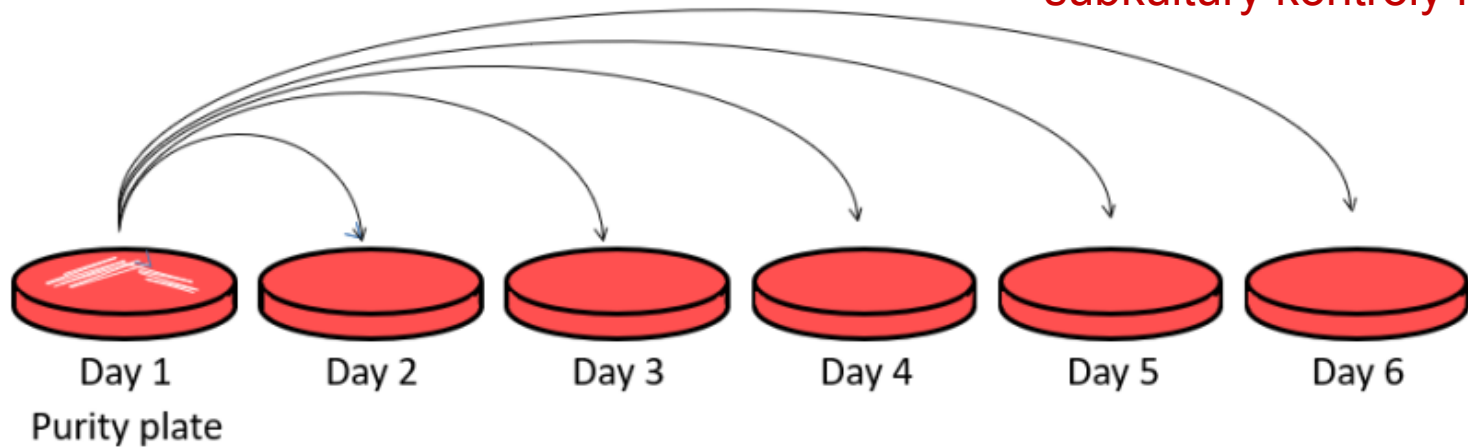


Jsou-li 2 z 20 testů mimo rozsah, musí se prověřovat proč

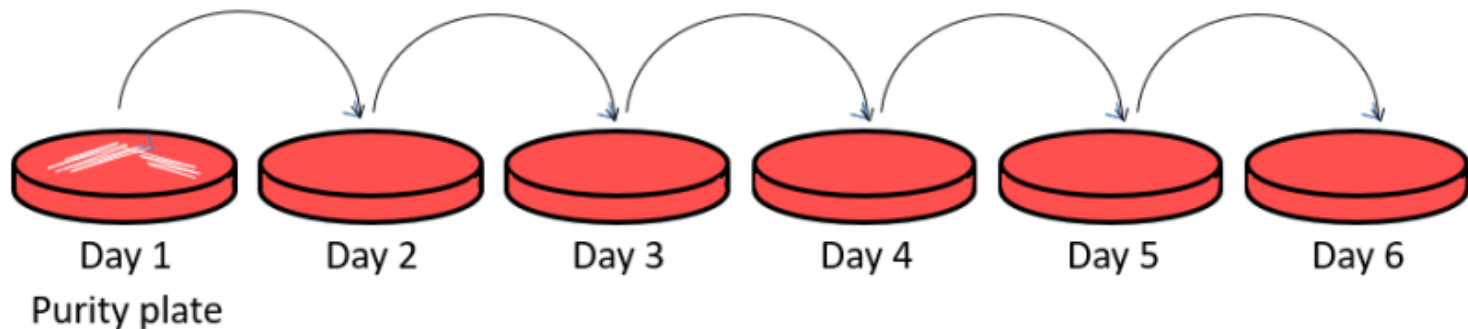
Subculturing of QC strains

Non-fastidious QC strains

Max 6 dnů lze z původního oživeného kmene dělat subkultury kontroly kvality



Fastidious QC strains



Nejčastější potenciální zdroje chyb

Možné příčiny chyb (1)

Půda	Uchovávání ploten
	Nedodržení postupu při přípravě
	Variabilita šarží nebo změna dodavatele
	Suplementy (variabilita šarží, chybná navážka, prošlá expirace)
	pH
	Výška agaru/objem agaru
	Datum expirace
Podmínky vyšetření	Nedodržení pravidla "15-15-15" (suspenze musí být naočkována do 15 min, disky kladeny do 15 min, inkubace do 15 min)
	Inkubace (teplota, prostředí a čas)
	Inokulum (málo/hodně koncentrované, nebo nehomogenní)
	Způsob odečítání
	Odečítání okraje zón

Možné příčiny chyb (2)

Disky	Nesprávný disk (chybné antibiotikum nebo obsah disku)
	Síla disku (nesprávné uchování, labilita, datum expirace)
	Nevyrovnání na pokojovou teplotu po otevření zásobníku disků
	Mnoho disků na plotně (interference mezi látkami)
Kontrolní kmeny	Nesprávný kontrolní kmen
	Mutace
	Kontaminace
	Stáří kultury

Interpretace zón

- Před interpretací výsledků se ověří, zda průměry inhibičních zón vytvořené kontrolními kmeny jsou v přípustném rozmezí.
- Naměřené průměry inhibičních zón se interpretují v kategoriích citlivosti (C, I a R) podle tabulek breakpointů EUCAST (EUCAST Breakpoint Tables (www.eucast.org), česky <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty>).

www.eucast.org

**Sledujte
pravidelné
aktualizace !!!**

Kontrola vyšetření citlivosti

- Používají se doporučené kmeny pro kontrolu kvality (viz EUCAST QC Tables (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/qc_tables/), česky Tabulky pro kontrolu kvality EUCAST (česky <http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast>).
- Pro kontrolu složky inhibitoru v discích obsahujících kombinaci β -laktam-inhibitor β -laktamázy se používají speciální producenti β -laktamázy. Tato kontrola se provádí rutinně. Aktivní složka se kontroluje standardními kmeny pro kontrolu kvality.
- Kontrolní kmeny s definovanou rezistencí lze použít ke kontrole schopnosti detekovat rezistenci (viz [EUCAST QC Tables](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/qc_tables/), (česky <http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast>).
- Kontrolní kmeny lze koupit ze sbírek kultur nebo z komerčních zdrojů.

EUCAST 2019 Verze 7.0


30

EUCAST

české překlady nejvýznamnějších dokumentů na stránkách SZÚ

<http://www.szu.cz/eucast-dokumenty>

Principy zůstávají stejné, ale sledujte aktuální verze: nyní **z ledna 2022**

 https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/



EUCAST Disk Diffusion Test Methodology

The EUCAST disk diffusion test is based on MH media and disks of a good quality. It is calibrated to EUCAST clinical breakpoints using broth microdilution for MIC determination. Updates are published regularly.

See also [EUCAST instruction videos](#).

- [Disk diffusion - Manual v 10.0](#) (1 January, 2022)
- [Disk diffusion - Slide show v 10.0](#) (1 January, 2022)
- [Disk diffusion - Reading guide v 9.0](#) (1 January 2022)
- [Anaerobic bacteria - disk diffusion methodology v 1.0](#) (1 January 2022) including QC recommendations.
Disk diffusion breakpoints for anaerobic bacteria are valid for FAA with 5% mechanically defibrinated horse blood as the only additive.
- [Anaerobic bacteria - disk diffusion reading guide v 1.0](#) (1 January 2022)
Disk diffusion breakpoints for anaerobic bacteria are valid for FAA with 5% mechanically defibrinated horse blood as the only additive.

Anaeroby
komplet NOVÉ !!

For translations to other languages - contact National AST committees (NAC).

For previous versions of documents - see ➔ [Previous versions](#).

Metodika a kontrola kvality.včetně kritérií QC



Reading guide

EUCAST disk diffusion for selected rapidly growing anaerobic bacteria on Fastidious Anaerobe Agar with 5% horse blood (FAA-HB)

Version 2.0
January 2023

ANAEROBY
UPDATE !!!

This reading guide applies to the EUCAST disk diffusion method for rapidly growing anaerobes based on Fastidious Anaerobe Agar with 5% horse blood (FAA-HB) and 16-20 h incubation with the following species:

- *Bacteroides* spp.
- *Prevotella* spp.
- *Fusobacterium necrophorum*
- *Clostridium perfringens*
- *Cutibacterium acnes*

- Read FAA plates from the **front** with the lid removed and with **reflected light**.
- Hold the plate about **30 cm from the eye at a 45-degree angle** to the work bench.
- Measure zone diameters with a **calliper or ruler** at the point of complete inhibition as judged by the naked eye.
 - In case of double zones, read the inner zone edge.
 - **If faint haze within the zone occurs, disregard haze and read the most obvious zone edge. Tilt the plate towards you to better define the obvious zone edge.**
 - Ignore haemolysis and swarming when reading zones.
- Isolated colonies within the inhibition zone should be taken into account when reading. **For clindamycin, it is particularly important to examine zones carefully for colonies growing within the zone.**

Pokyn pro správné odečítání včetně fotografií !

Bacteroides spp.



Piperacillin-tazobactam



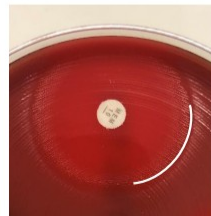
Piperacillin-tazobactam



Piperacillin-tazobactam



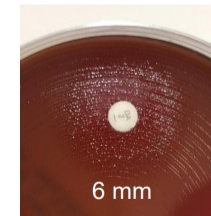
Meropenem



Meropenem



Meropenem



Clindamycin



Metronidazole

AST of bacteria

Organization

Consultations

EUCAST News

New definitions of S, I and R

Clinical breakpoints and dosing

Rapid AST in blood cultures

Expert rules and expected phenotypes

Resistance mechanisms

Guidance documents

SOP

MIC and zone distributions and ECOFFs

AST of bacteria

IVDR

Media preparation

MIC determination

Disk diffusion methodology

Disk diffusion implementation

Breakpoint tables

Quality Control

Strains with defined susceptibility

Calibration and validation

Warnings!

MIC testing services from EUCAST

Previous versions of documents

AST of mycobacteria

AST of fungi

AST of veterinary pathogens

Frequently Asked Questions (FAQ)



EUCAST Disk Diffusion Test Methodology

The EUCAST disk diffusion test is based on MH media and disks of a good quality. It is calibrated to EUCAST clinical breakpoints using broth microdilution for MIC determination. Updates are published regularly.

The EUCAST Development Laboratory has systematically investigated the quality of MH-powders, antibiotic disks and of pre-poured MH plates for disk diffusion. The publications from these investigations are available from the EUCAST website ([antibiotic disk quality](#), [MH powder quality](#), [the quality of pre-poured MH plates](#)).

See also [EUCAST instruction videos](#) with subtitles in many languages.

- [Disk diffusion manual v 11.0](#) (2 January, 2023)
- [Disk diffusion - Slide show v 11.0](#) (2 January, 2023)
- [Disk diffusion - Reading guide v 10.0](#) (2 January, 2023)
- [Anaerobic bacteria - disk diffusion methodology v 2.0](#) (2 January 2023). QC recommendations are now included in the general [QC document](#). Disk diffusion breakpoints for anaerobic bacteria are valid for FAA with 5% mechanically defibrinated horse blood as the only additive.
- [Anaerobic bacteria - disk diffusion reading guide v 2.0](#) (2 January 2023). Disk diffusion breakpoints for anaerobic bacteria are valid for FAA with 5% mechanically defibrinated horse blood as the only additive.

For translations to other languages - contact National AST committees (NAC).

For previous versions of documents - see → [Previous versions](#).

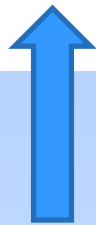


EUCAST klinické breakpointy



Antimicrobial susceptibility testing

EUCAST disk diffusion method



Metodiky
Verze 11.0
2023

Všimněte si
zelených prokliků
=> upřesnění, i
např. videa

Aktuální verze 13.0, leden 2023

Clinical breakpoints - breakpoints and guidance

January 2, 2023

- [Clinical breakpoints \(v 13.0\)](#) - file for printing (2 Jan, 2023)
- [Clinical breakpoints \(v 13.0\)](#) - file for screen (2 Jan, 2023)
Major changes between breakpoint tables v 12.0 and 13.0 are: breakpoints and methods for *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans** added, several I categories removed (macrolides, tetracyclines, rifampicin), aminopenicillin breakpoints for *Enterobacterales* revised (flow chart soon to be published), additional breakpoints and dosages in meningitis, and several minor technical changes and clarifications. For a complete list of changes, see breakpoint table, tab "Changes". The revision of aminopenicillin breakpoints in *Enterobacterales* has been addressed in a [guidance document](#) (14 Jan, 2023).
*EUCAST has received queries on difficulties encountered with some databases when trying to distinguish between on one hand *C. ulcerans* and on the other *C. pseudotuberculosis* and *C. silvaticum*. Both species are uncommon in humans and have lower clindamycin MIC values than *C. ulcerans*. Neither has been considered or validated when EUCAST breakpoints were determined. Check the clinical relevance of the finding and if consider checking with a reference laboratory.
- [Clinical breakpoints - fungi](#)
- [Dosages \(v 13.0\)](#) - file for printing and screen (2 Jan, 2023)

Before using the EUCAST breakpoint tables..... there are changes in the breakpoint tables every year. Some may be difficult to understand or accept without having followed the development of and consultations on "breakpoints-in-brackets, breakpoints "for screen only" and the changing definitions of the susceptibility categories, especially the change from the old "intermediate" (I) to the new "Susceptible, increased exposure" (I). Users of the tables are urged to inform themselves on definitions of S, I and R, the use of the arbitrary, off-scale breakpoints and the fact that *Pseudomonas aeruginosa*, for many agents, is never reported S, only I, but is still possible to treat provided the dosing and mode of administration is considered. Visit the section on new definitions of S, I and R, the recorded webinar on how to handle the "Susceptible, increased exposure category" and read the first few tabs in the breakpoint table (Notes, Guidance, Dosage, Technical uncertainty). Also, backtrack through "[consultations](#)" to better understand how these were developed. For questions and comments on breakpoints, use the EUCAST [subject related contact form](#).

Make sure the device you are using for the presentation of tables can correctly display footnotes (Note₁, Note₂) and other typographical tools.

- EUCAST instruction video on how to use the breakpoint table - [download here](#).

SPECIFIKA ODEČÍTÁNÍ

viz EUCAST prezentace
a video:

[https://www.youtube.com/watch?v=aLFLTbAgVi0&list=P
LQU_kWRWBld4X9Acg59iNKIj4QwNRJShJ&index=4](https://www.youtube.com/watch?v=aLFLTbAgVi0&list=P
LQU_kWRWBld4X9Acg59iNKIj4QwNRJShJ&index=4)

Disková difúzní metoda

sdělování výsledků

Zásady pro sdělování výsledků praktickému lékaři :

(dle metodického listu č. 16, 22.4. 1998, NRL ATB SZÚ Praha, CEM 5 / 98 str. 195, nicméně stále užitečné !)

Základní sdělená antibiotika :

- **C** nebo **R** daného původce infekčního onemocnění **k základním atb** (atb. tzv. první volby pro danou infekci a daného původce) **se sděluje vždy**.

Do závorky lze uvést další testovaná antibiotika bez sdělení konkrétních výsledků, ale s telefonním číslem pro konzultaci či s dalším doplňujícím textem.

Selektivně sdělená antibiotika:

- **C** nebo **R** k těmto antibiotikům se sděluje při rezistenci k některému ze základních nebo dalších vyšetřených antibiotik. V této skupině mohou být u veterinárií uvedena také atb s indikačním omezením a to v případě rezistence k základním antibiotikům.

Ostatní antibiotika :

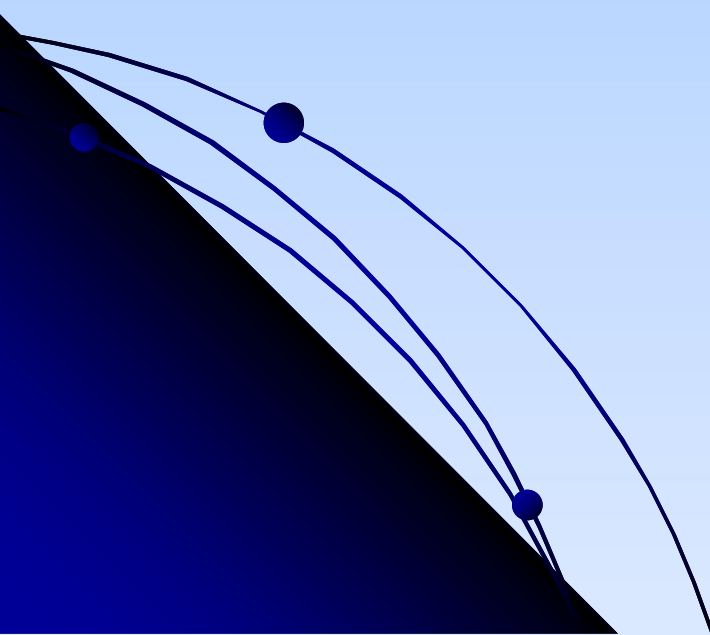
- **C** nebo **R** k antibiotikům, která pro daný druh bakterie nepatří mezi základní nebo selektivně sdělená antibiotika (ve veterinární medicíně se týká antibiotik s indikačním omezením) se sděluje v souladu se zásadami antibiotické politiky podle:
 - kvalifikované rozvahy o účelnosti těchto antibiotik pro terapii podle
 - závažnosti a druhu infekce,
 - podle druhu situace v dané lokalitě,
 - podle výskytu rezistentních kmenů event. podle předchozí terapie,
 - ve veterinární medicíně i podle druhu chovu.

Disková difúzní metoda: sdělování výsledků

Je-li bakteriální původce ohrožující život jedince nebo jedinců a závažně ovlivňující epidemiologickou situaci v daném místě (JIP, oddělení, ve veterinární medicíně chov), či jedná-li se o multirezistentní kmen bakteriálního původce daného onemocnění:

- Sdělují se výsledky všech antibiotik přicházejících do úvahy pro léčbu spolu s komentářem a přehledem o rezistenci v daném místě (oddělení, lokalita, chov) – jsou-li tyto přehledy k dispozici.
- Zároveň je vhodné uvést kontaktní telefon pro konzultace.

E-test



E-test

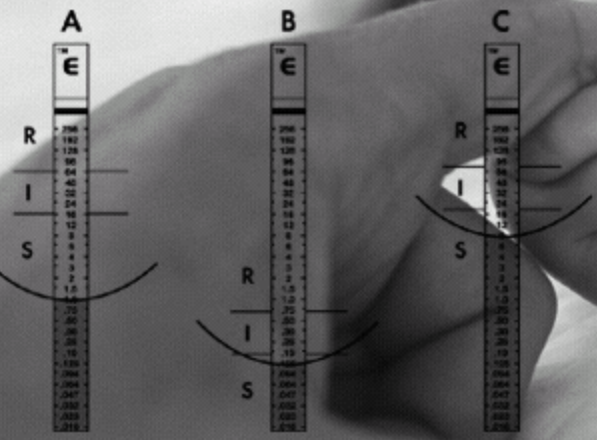
KVANTITATIVNÍ test citlivosti k antimikrobiálním látkám

- je relativně nová metoda,
- princip agarové difúze, ale kombinuje difúzní a diluční přístup pro *in vitro* stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám pro široké spektrum mikroorganismů, nevyjímaje ani vláknité organismy a anaeroby,
- E-test je jednoduše proveditelný,
- **na rozdíl od diskové difúzní metody ukazuje i MIC,**
- praktický pouze tehdy, je-li nutno otestovat **jen malé** množství různých atb - z důvodů pracnosti a nákladnosti,
- velkou výhodou tohoto testu atb testované rutinně na MIC panelu může být testováno individuálně.
- Snadná modifikace pro vláknité mikroorganismy kdy je použito speciální nutričně vyhovující pevné médium.

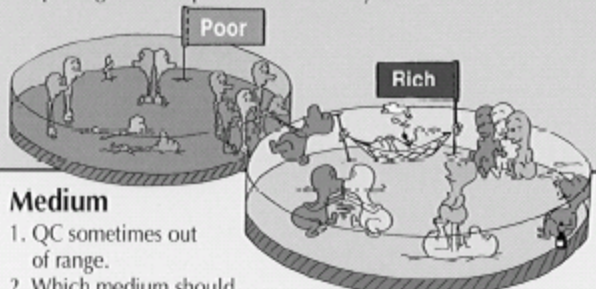

Etest[®] UNIQUE • PRECISE • FLEXIBLE

MIC to target therapy in critical patients

Susceptible to drugs A, B and C yet, which would YOU choose?



Etest[®] Trouble Shooting

PROBLEM	HELP/CHECK
Inoculum 1. Sparse growth despite correct turbidity. 	1a. Use colony counts to verify cfu/ml. b. Use suspension of fastidious organisms (in broth not saline) within 15 minutes. c. Check quality of McFarland standard. d. Use 1 McFarland for mucoid organisms. e. Check organism growth on the medium.
Medium 1. QC sometimes out of range. 2. Which medium should be used with Etest?	1a. Check media and supplements. b. Test another batch or brand. c. Check expiry date, growth of organism, pH and agar depth. 2. See NCCLS M100-S, table 7 and Etest Media/Inoculum/Incubation Guide.
Incubation 1. QC in CO ₂ above NCCLS range. 2. Metronidazole: clinical or artefactual resistance? 	1. Use CO ₂ QC ranges for macrolides, lincosamides, streptogramins, aminoglycosides and quinolones (CIS 1A). 2a. Check anaerobic system w.r.t. leaks, flushing, gas mixture and catalyst. b. Ensure that an Eh -450 mV is achieved within the first few hours (CIS 3). c. QC with an obligate anaerobe.

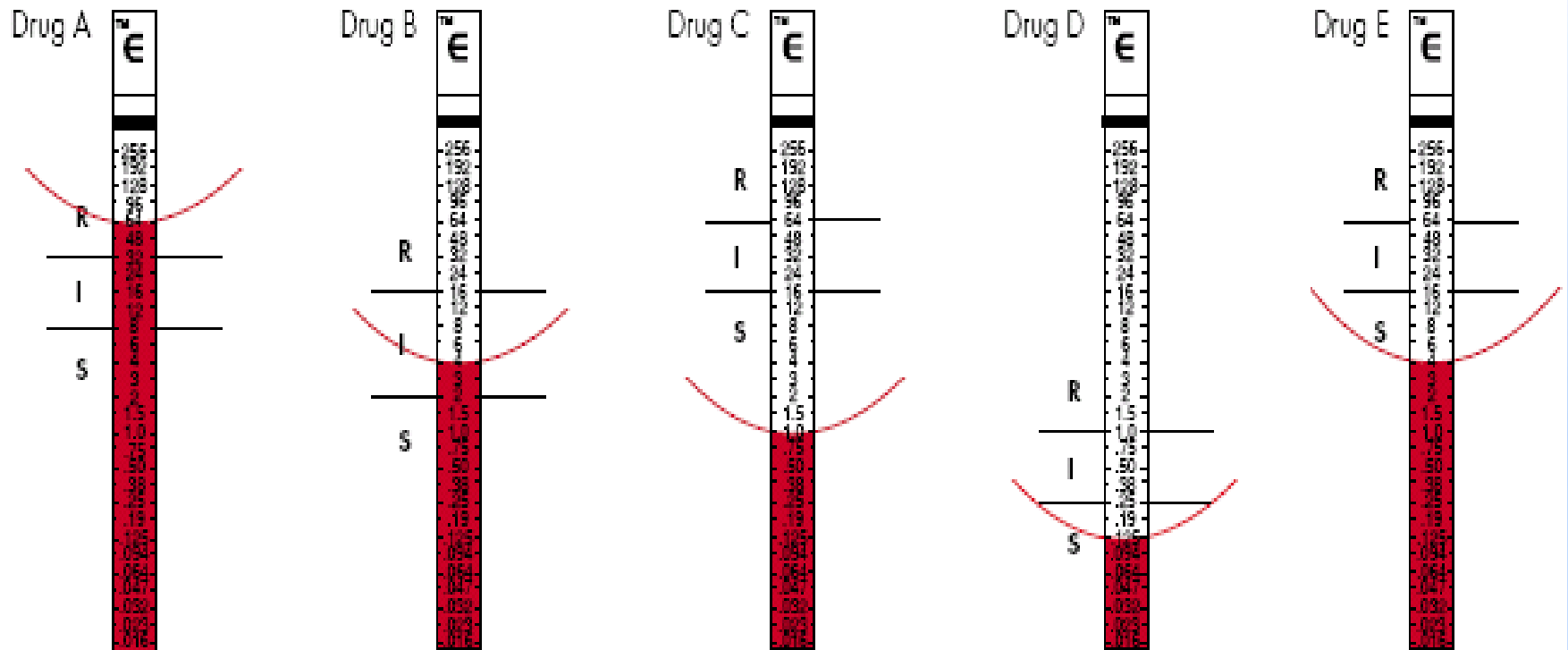
E-test - PRINCIP

- Je obdobný jako u difúzní diskové metody,
- vyžaduje standardní inokulum mikroorganismů nanesené na povrch agarové plotny,
- na plotnu jsou aplikovány E-testové proužky, obsahující na svých okrajích gradient antimikrobiální látky, která proniká do média a ovlivňuje nárůst bakterií.
- Antimikrobiální látka difunduje do agaru a vytváří kontinuální koncentrační gradient antibiotika, který je vytvořen podél stran E - proužku.
- Po inkubaci se vytvoří elipsoidní inhibiční zóna.
- MIC je odečtena v místě, kde se hranice růstu bakterií protíná s okrajem proužku.

E-test - PRINCIP

- Může být vyčísleno široké spektrum koncentrace antimikrobiální látky, protože je umožněna kontinuální diluce (rozředění).
- V závislosti na antibiotiku, gradient pokrývá kontinuální koncentrační spektrum od
 - 0,016 do 256 nebo
 - 0,002 do 32 mg / ml.
- Toto spektrum koresponduje s 15 dilučními koncentracemi v konvenčním MIC testu.
- Použití klasifikace citlivý, intermediární, rezistentní s příslušným kvantitativním vyjádřením MIC
- Zvláštní pozornost je třeba věnovat testování anaerobů.

R - Resistant I - Intermediate S - Susceptible



MIC	64	4	1	0.125	4
MBQ	0.125	0.5	16	2	4
CAT	R	I	S	S	S

Expected efficacy in order of MBQ: Drug C > E > D > B > A *In vitro* activity in order of MIC: Drug D > C > B > E > A

E-test - Postup

- Vyjmutí P.M. a proužků z chladničky a ponechání k vytemperování při laboratorní teplotě
- **Inokulace P.M.**
(hustota na 0,5 Mc Farlanda, inokulum se dobře protřepe pro zajištění homogenity, nanést na P.M. a přebytek po cca 15 s odsát)
- **Aplikace proužků**
- **Umístění do termostatu a inkubace**
(přizpůsobit specifickým nárokům mikroorganismů)
- **Hodnocení a interpretace**

E-test – aplikace proužků

- Umístěte vyznačením MIC na lícové straně nahoru , tak že antimikrobiální látka je na rubové straně proužku, nesmí se poškrábat rubové strany proužku.
 - Používáte - li pinzety, uchopte opatrně na konci proužku s označením **E** . Ověřte si, že proužky jsou od sebe bezvadně odděleny před aplikací na povrch agaru.
 - Používáte - li E-test aplikátor, ujistěte se že adhesivní páska dodávaná s aplikátorem je aplikována ve správné pozici (na každém konci aplikátoru).
- nejvyšší koncentrace u okraje misky.
- celá plocha proužku byla v kontaktu s agarem.
- používáte - li pinzety pokládejte jako první **E** konec proužku na agar.
- P.M. o průměru 100 mm - pouze jeden proužek na misku a umístěte jej do středu misky.
- P.M. o průměru 150 mm - neumísťujte více než 6 E-test proužků na misku. Umístěte proužky ve stejnoměrné vzdálenosti, tak aby paprscitě vybíhaly ze středu misky. Okraj proužku označený **E** by se měl dotýkat okrajů misky.

E-test – aplikace proužků

- Přitiskněte proužky k povrchu agaru a ubezpečte se , že proužky jsou v bezprostředním kontaktu s povrchem půdy.
- Odstraňte velké vzduchové bubliny pod proužkem použitím pinzety a opatrným tlakem na proužek. Začněte pod bublinkou a pohybujte pinzetou směrem po koncentračním gradientu směrem ke konci označeném **E** . Přítomnost malých bublinek nemůže způsobit chybu v testu.
- Po uložení E-test proužku na plochu agaru nepohybujte již s proužkem do jiné polohy. Po té, co proužek přilnul k povrchu agaru, antimikrobiální látka ze spodní strany proužku okamžitě difunduje do půdy.
- Pokud proužek upadne na povrch agaru horní stranou dolů, opatrně jej pinzetou nadzvedněte, obraťte a umístěte na povrch agaru.
- Jestliže proužek upadl na povrch pracovního stolu nebo jiného objektu, může být použit pokud se nedostal do styku s vlhkostí

DRUG RELATED EFFECTS



Bactericidal drugs such as aminoglycosides give sharp "crisp" ellipses. MIC 0.064 $\mu\text{g/ml}$.

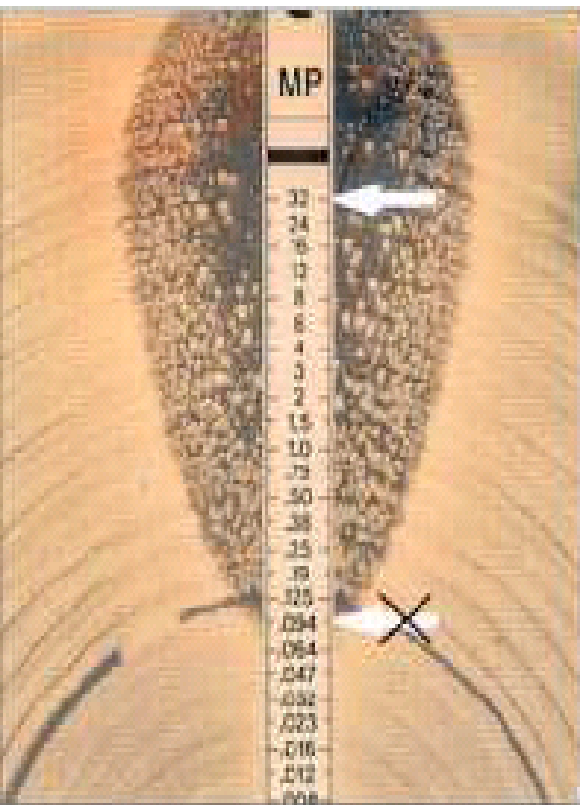


Bacteriostatic drugs such as trimethoprim and sulphonamides can give diffuse edges. Read at 80% inhibition. MIC 3 $\mu\text{g/ml}$.

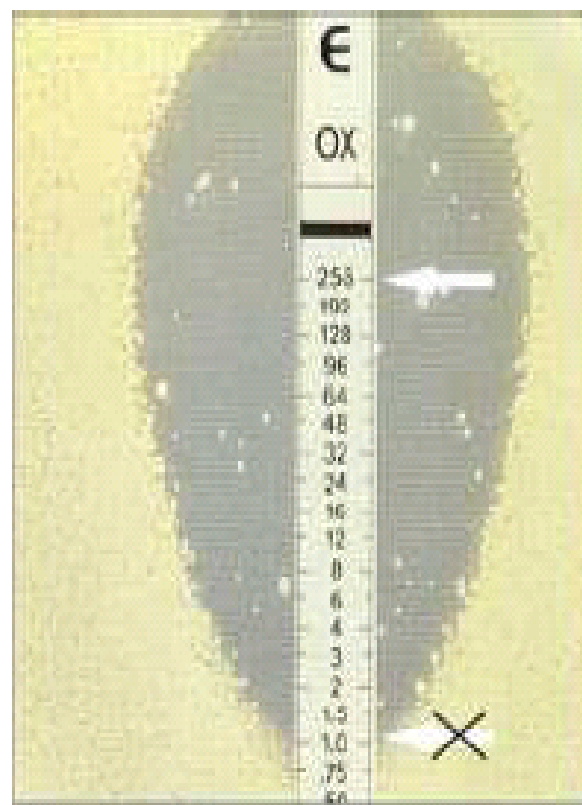


β -lactamase inhibitors at constant levels can extend the ellipse below the MIC due to intrinsic activity. Extrapolate the upper curvature towards the strip to get the MIC. MIC 0.75 $\mu\text{g/ml}$.

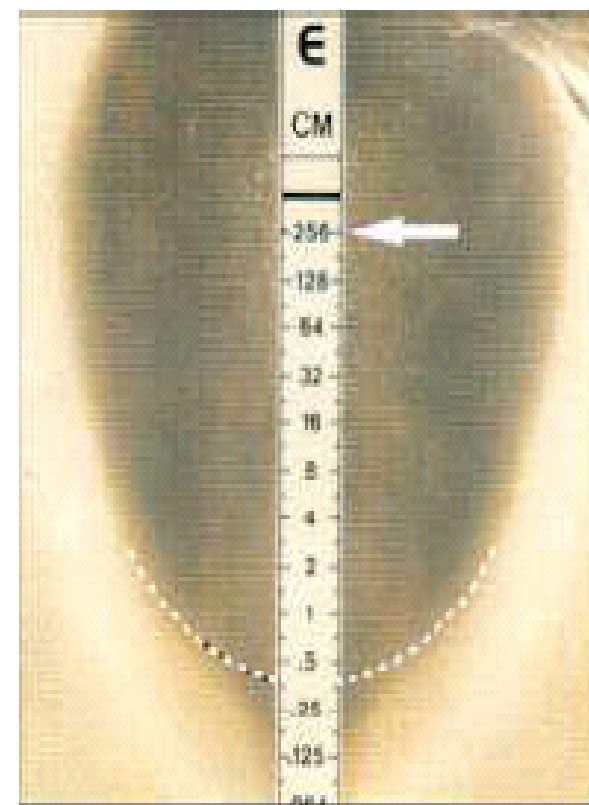
RESISTANCE MECHANISM RELATED EFFECTS



Read where the resistant subpopulation is completely inhibited. MIC > 32 µg/ml.

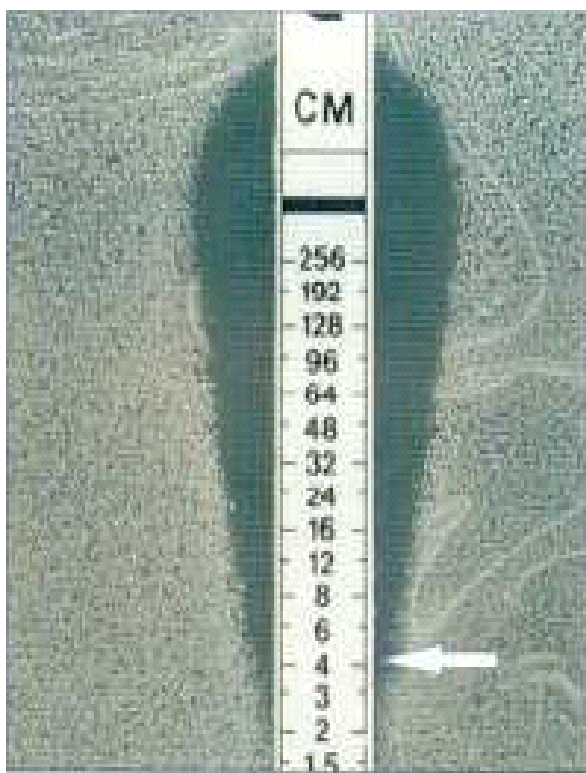


Isolated resistant colonies due to low-level mutation. MIC > 256 µg/ml.

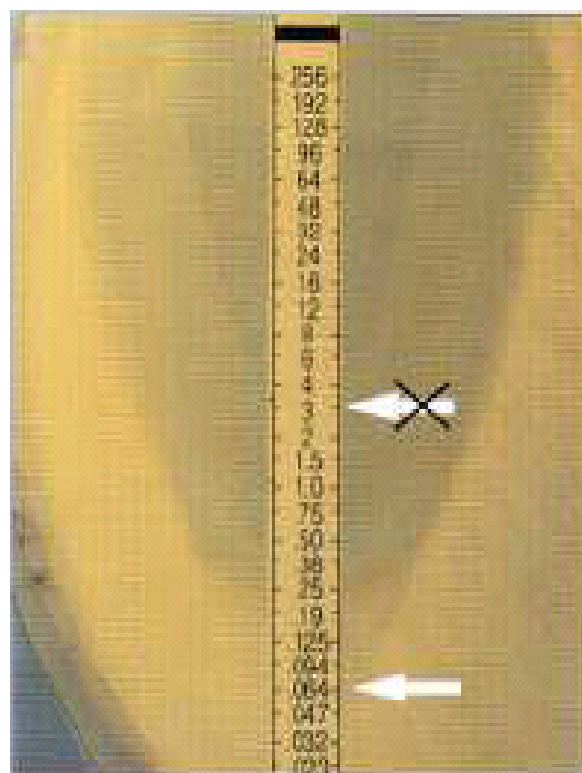


"Dip" effect due to inducible macrolide resistance. Extrapolate the ellipse towards the strip to get the MIC, i.e. 0.38 µg/ml. This strain also has colonies at the upper range of the strip. MIC > 256 µg/ml.

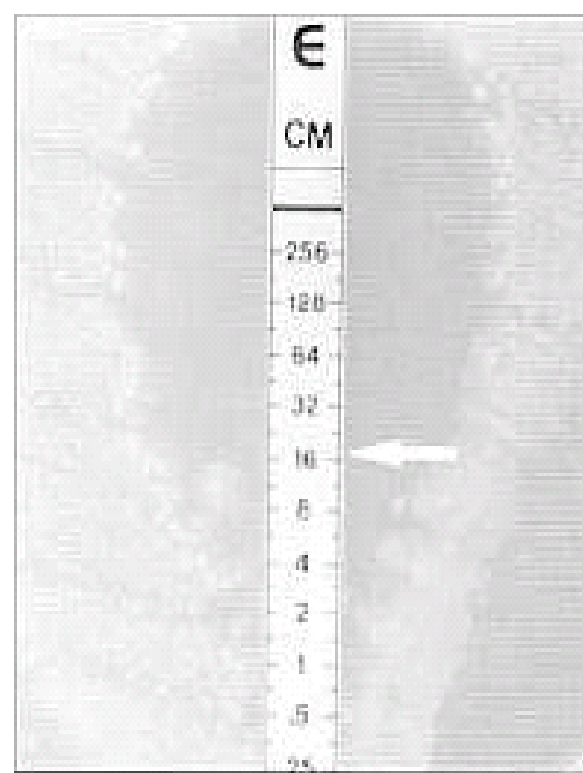
ORGANISM RELATED EFFECTS



Look for microcolonies when reading enterococci. MIC 4 µg/ml.



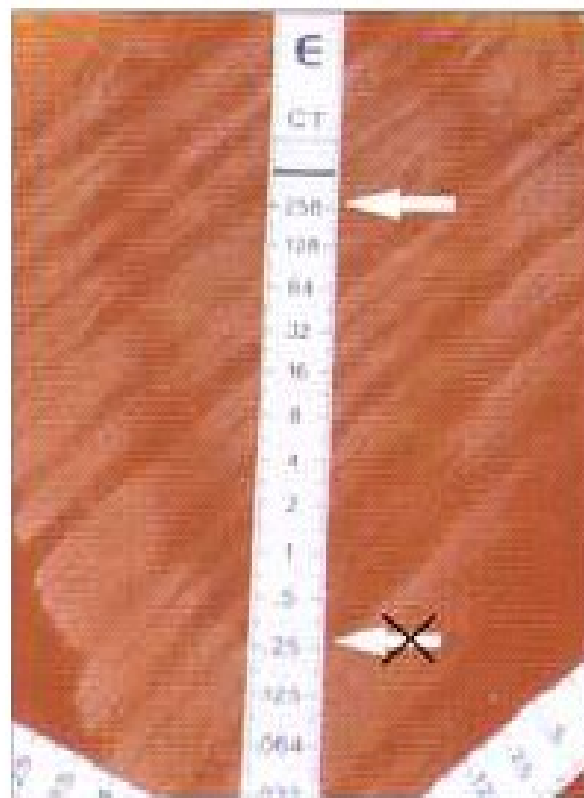
Ignore swarming caused by *Proteus* species. MIC 0.064 µg/ml.



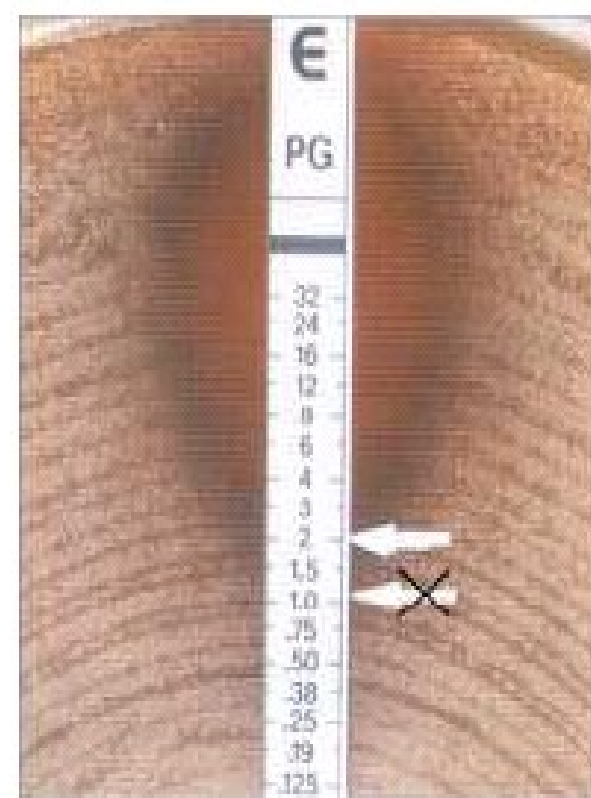
Read all individual colonies in clindamycin ellipses for anaerobes. MIC 16 µg/ml.



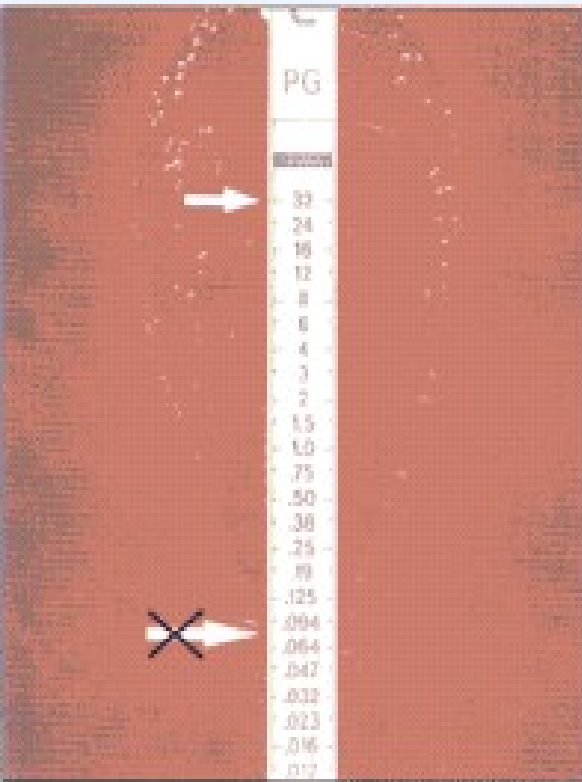
Tilt the plate to visualize pin-point colonies and hazes, especially for enterococci, pneumococci, fusobacteria, *Acinetobacter* and *Stenotrophomonas* spp. MIC 1 $\mu\text{g/ml}$.



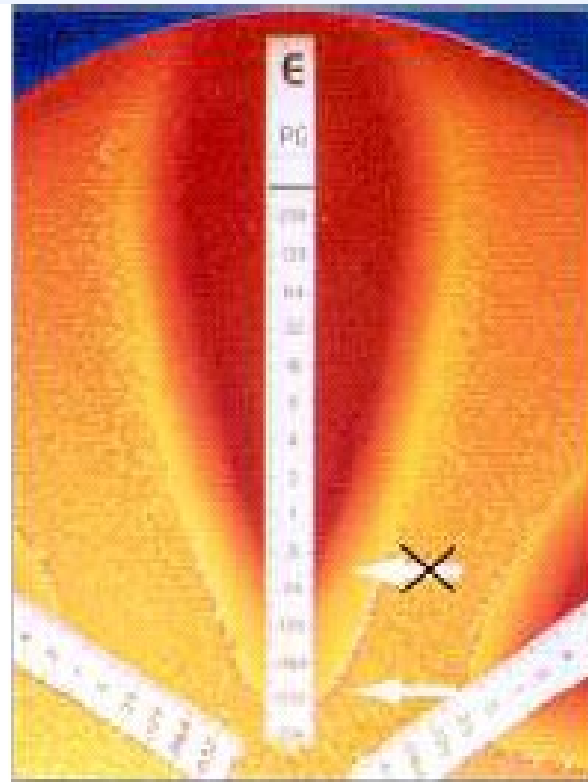
Paradoxical effect gives inhibition at low MIC with regrowth at higher MIC. MIC > 256 $\mu\text{g/ml}$.



Scrutinize pneumococcal end-points carefully to pick up all microcolonies. Tilt the plate and/or use a magnifying glass. MIC 2 $\mu\text{g/ml}$.



A highly resistant subpopulation in pneumococci. MIC > 32 µg/ml.

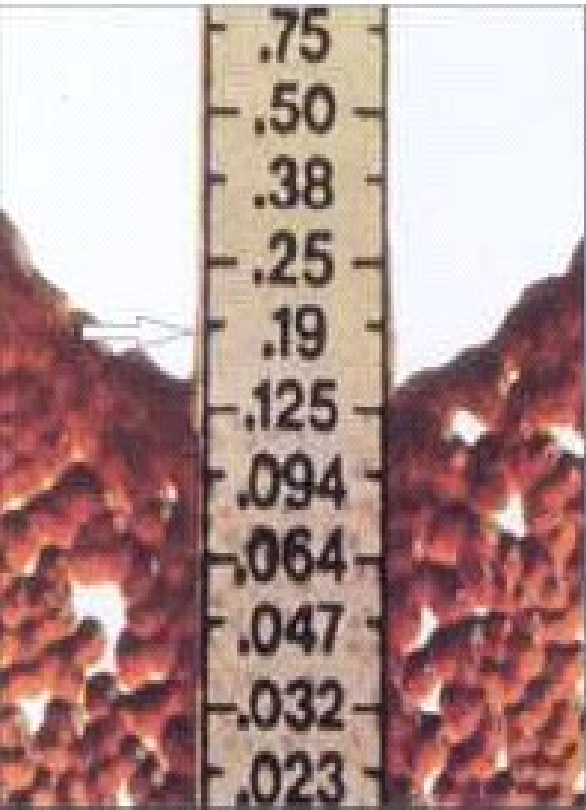


Ignore haemolysis and read where growth is inhibited. MIC 0.032 µg/ml.

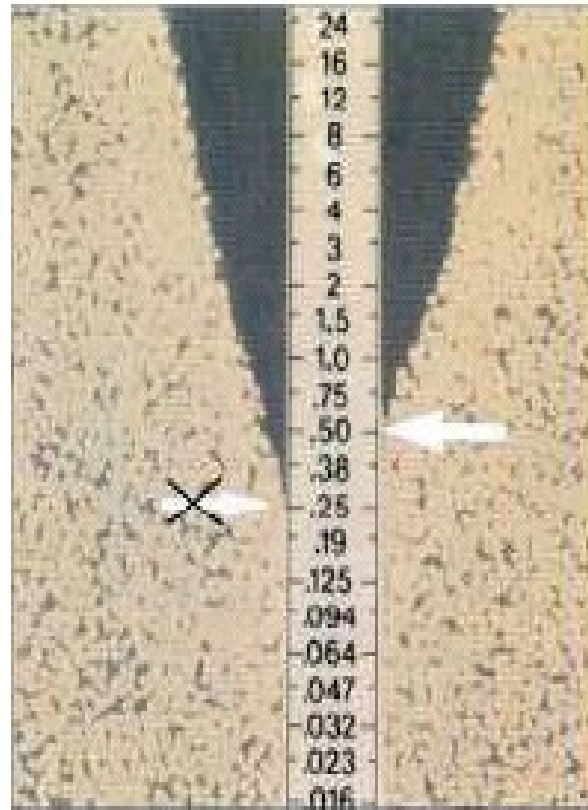


Coagulase negative staphylococci can show trailing at the end point due to glycopeptide resistant subpopulations. MIC 12 µg/ml.

TECHNICAL & HANDLING RELATED EFFECTS



Intersection in between markings. Read the next higher value. MIC 0.19 $\mu\text{g/ml}$.



Different intersections on either side of the strip. Read the higher value; if the difference is > 1 dilution, repeat the test. MIC 0.5 $\mu\text{g/ml}$.



Ignore a thin line of growth at the edge of the strip caused by organisms growing in a tunnel of water. MIC 0.25 $\mu\text{g/ml}$.

Upozornění:

Prezentace je určena výslovně pro účely výuky,

použité fotografické materiály pocházejí z citovaných zdrojů:

Web stránky EUCAST a SZÚ

Web stránky ABBIODISC (<http://www.genetixbiotech.com/images/pdf/AB%20Biodisk.pdf>)

E-test reading guide (slidy 38 - 43)

Prezentace není určena k dalšímu šíření.